

が同定された。興味深いことに、ATL 患者末梢血における本受容体リガンド蛋白濃度を測定したところ、ATL 患者の多くで血中レベルが亢進していることが確認された。同受容体を血液細胞株に強制発現させた場合にも、同リガンド依存性の DNA 合成が確認された。

これらの知見は ATL の病期進展機構に新たな視野を開くものであり、適切にデザインされたゲノミクス解析が有用である事を示唆するといえる。

大腸癌における DNA 異常メチル化のゲノムワイドスクリーニング

地域医療学系専攻 4 年 鯉沼 広治

(目的) 通常大腸癌とは異なる臨床学的、分子生物学的背景を有する「メチル化陽性大腸癌」の発癌メカニズムを探るため、それに関与するメチル化遺伝子の同定を目的とした。

(方法) メチル化遺伝子数が極端に異なると予想される hMLH1メチル化陽性大腸癌と同陰性大腸癌の癌組織を対象として MCA-RDA 法を行い、その 2 群間でメチル化レベルの異なる DNA 断片のスクリーニングを行った。得られたゲノム断片が遺伝子の 5'側 CpG island に相同性を持つ場合、その遺伝子のメチル化状態を多数の癌および正常粘膜において検証した (COBRA 法)。癌抑制遺伝子の候補に関してはメチル化と遺伝子発現との関連を Real-time RT-PCR にて検討した。

(結果) DNA 断片を 288 個クローニングし、5' CpG を含む 70 遺伝子を同定した。うち 41 遺伝子についてメチル化プロファイルを作成したところ、28 遺伝子は異常メチル化遺伝子と考えられた。hMLH1メチル化陽性癌サンプルは、他のほとんどの遺伝子にもメチル化を認める特殊な大腸癌群であった。28 遺伝子は 3 つのグループに分けることができた。①メチル化状態が hMLH1 に相同性の高いグループ、②多くの癌でメチル化を認めるが正常粘膜には認めないグループ、③癌および正常粘膜にもメチル化を認めるグループである。癌抑制遺伝子の候補と考

えられた BMP3 は多くの癌でメチル化を認め、正常粘膜には認めなかった。癌における BMP3 発現量は、正常粘膜に比べ有意に低下していたが ($p=0.02$)、メチル化の有無により発現量に差を認めなかった。

(考察) 癌組織を用いた MCA-RDA 法により、28 個の癌特異的メチル化クローンが同定できた。これは細胞株を用いた実験報告に比べ非常に好成績であり、癌組織を実験材料に用いた解析を積極的に行うべきだと考えられた。TGF-beta superfamily に属する BMP3 において、異常メチル化と発現量低下との相関が認められなかった理由として、BMP3 を不活化する他の要因 (LOH や点突然変異) が関与している可能性と、COBRA 法で検証した CpG site が発現調節に直接的に関与する部位ではない可能性が考えられた。メチル化プロファイルから得られた 3 つの遺伝子グループでは、①は hMLH1 と協調してあるいは同時期に発癌に関与している可能性、②は癌特異的メチル化遺伝子群、③グループは発癌に至る前からメチル化が存在したと考えられた。特に MIG2 は、hMLH1メチル化患者の癌と正常粘膜特異的にメチル化を認め、メチル化関連大腸癌危険群の早期診断マーカーとなる可能性がある。

(結論) 大腸癌新鮮凍結組織を用いたメチル化遺伝子のスクリーニングにより、癌特異的メチル化を認める多数の遺伝子が同定された。メチル化関連大腸癌の発癌過程でこれらのメチル化遺伝子がどのように関与しているかについては、今後の重要な検討課題であると考えられる。

ガラニン様ペプチドによる NPY ニューロン刺激と脂肪嗜好性における役割

地域医療学系専攻 4 年 倉持 素樹

Galanin-like peptide (GALP) は、摂食亢進因子である galanin とアミノ酸配列の一部を共有するペプチドとして発見された。GALP をラットの脳室内へ投与すると強い摂食亢進作用を示すが、その作用発現機序や生理的な意義はわかっていない。本研究では、GALP による摂

食亢進機序が、どの摂食関連核の、如何なるニューロペプチドを介しているのかを明らかにすることを目的とした。

動物は300~330gの成熟雄ラットを用いた。まず GALP をラットの脳室内に投与すると vehicle を脳室内に投与した時と比べて、摂食亢進が投与後1.5時間まで認められたが、24時間後までの総摂食量には変化なかった。GALP を摂食に関係する室傍核、視床下部外側野、背内側核、弓状核に局所投与し、投与後2時間までの摂食量を比べた。脳室内に vehicle を投与したときの摂食量をコントロールとしたとき、背内側核に GALP を投与したときのみ、有意に摂食亢進が認められたが、同用量モル数の galanin を局所投与しても摂食亢進は認められなかった。GALP を脳室内に投与すると vehicle 投与に比べ、c-Fos 蛋白質の陽性率は背内側核の NPY 含有細胞で選択的に増加した。さらに背内側核から単離した NPY 免疫陽性細胞36個中5個が GALP の添加によって細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が上昇したが、galanin を加えても $[Ca^{2+}]_i$ は上昇しなかった。NPY 受容体のアンタゴニストや抗 NPY 抗体をあらかじめ脳室内に投与し、続いて GALP を脳室内に投与すると GALP による摂食亢進は阻害された。両側背内側核の破壊ラットに対し、GALP を脳室内に投与すると、GALP による摂食亢進作用が偽手術群に対し有意に低下した。これらの結果から、GALP の脳室内投与における摂食亢進には背内側核の NPY 含有細胞が重要な働きをしていることが示された。続いて摂食亢進に重要であると考えられている弓状核を破壊したラットに GALP を脳室内投与しても摂食亢進作用に変化がなく、弓状核から単離した NPY 含有細胞に GALP を加えても $[Ca^{2+}]_i$ が上昇しなかった。このことは GALP による摂食亢進作用に弓状核の NPY 含有細胞は関与していないことを示す。また、高炭水化物と高脂肪食を自由に摂取させたラットの高脂肪食摂食カロリー比より、脳室内に GALP を投与した後の高脂肪食摂食カロリー比が有意に増加した。

これらのことより、GALP の脳室内への投与による短時間の摂食亢進作用は、背内側核の NPY 含有細胞を介していて、弓状核の NPY

含有細胞は関与しないこと、また GALP の脳室内への投与は脂肪嗜好性を高める可能性を示した。